

مقایسه تأثیر عصاره گیاهی آویشن، میخک و دارچین با نیستاتین بر میزان مهار کاندیدا آلبیکانس (مطالعه آزمایشگاهی)

دکتر فاطمه اربابی کلاتی^۱، دکتر معصومه شیرزایی^۲، دکتر مهسا پورزمانی^۲، دکتر سروش دبیری^۲

۱- استادیار بخش بیماریهای دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۲- دستیار بخش بیماریهای دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

۳- مربی گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

خلاصه:

سابقه و هدف: به دنبال پیشرفت علم و توجه بیشتر به مسائل سلامت، استفاده از داروها افزایش یافته است. با توجه به عوارض جانبی، قیمت بالا و مراحل پیچیده تولید داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به شیوع کاندیدا آلبیکانس در محیط دهان، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضد قارچی ۳ گیاه آویشن، میخک و دارچین با نیستاتین در محیط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی اثرات ضد قارچی سه گیاه دارویی روی کاندیدا آلبیکانس سنجیده شد. گیاهان مورد نظر آویشن، دارچین و میخک بودند. این گیاهان بر حسب استفاده‌های دارویی قدیمی و مطالعات گذشته‌ای که انجام شده بود انتخاب شدند. کاندیدا آلبیکانس در محیط Sabuward Agar حاوی کلرامفنیکل، کشت داده شد. سه سری ۱۰ تایی از عصاره گیاهان مورد نظر و یک سری ۱۰ تایی از دیسک آغشته به نیستاتین آماده شد. داخل هر پلیت، ۱ دیسک عصاره گیاهی، ۱ دیسک نیستاتین به عنوان کنترل مثبت و یک دیسک متانول و ۱ دیسک خالی به عنوان کنترل منفی گذاشته شد. بعد از ۲۴ ساعت، میزان قطر هاله عدم رشد هر عصاره گیاهی با میزان قطر هاله عدم رشد کنترل مثبت با آنالیز ANOVA مقایسه شد.

یافته‌ها: میزان مهار کاندیدا در گروه نیستاتین برابر $(0/84 \pm 32/6)$ و در گروه عصاره گیاهی دارچین برابر $(0/82 \pm 31/3)$ و عصاره میخک برابر $(0/82 \pm 27/4)$ و بالاخره در آویشن برابر $(0/82 \pm 13)$ بود. $(P < 0/000)$

نتیجه گیری: آویشن، میخک و دارچین تأثیرات ضد قارچی روی کاندیدا آلبیکانس را دارند.

کلید واژه‌ها: ضد قارچی، آویشن، میخک، دارچین، عصاره گیاهی، نیستاتین

وصول مقاله: ۹۰/۶/۵ اصلاح نهایی: ۹۰/۷/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۰/۸/۸

مقدمه:

موضعی و سیستمیک شایع است و دهان شویه‌ها بطور معمول برای کاهش میکروارگانیسم‌های حفره دهان استفاده می‌شوند. این دهان شویه‌های شیمیایی همچون کلرگزیدین عوارض جانبی مخصوص به خود دارند.^(۱) بنابراین کشف گیاهان دارویی که تأثیرات ضد میکروبی داشته باشند برای کاهش عوارض جانبی و کم کردن اثرات سمی روی بافت و همچنین از لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به صرفه است. در این مطالعه اثر ضد قارچی سه گیاه روی کاندیدا آلبیکانس که فرصت طلب‌ترین میکروارگانیسم در حفره دهان است با نیستاتین که یک داروی ضد قارچی است مقایسه می‌شود. در مطالعات گذشته، تأثیرات

مطالعاتی که در دهه اخیر انجام شده است به وضوح نشان دهنده اثرات ناخوشایند داروهای شیمیایی در کنار اثرات مفید آنها می‌باشد. به خاطر افزایش مقاومت دارویی نسبت به داروهای شیمیایی جدید، مطالعات اخیر توجه بیشتری به استفاده از گیاهان دارویی کرده است. بیشتر مطالعات گذشته در مورد پاتوژن‌های ویژه‌ای که سیستم پوست، تنفسی و گوارشی و ادراری را درگیر می‌کند صورت گرفته است و مطالعات کمی در مورد پاتوژنهای مخاط دهان انجام گرفته است.^(۱) در رشته دندانپزشکی استفاده از مواد ضد میکروبی

[#] نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر معصومه شیرزایی استادیار بخش بیماریهای دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان. تلفن همراه: ۰۹۳۶۳۸۰۳۷۱۹؛ تلفن: ۰۵۴۱ ۲۴۴۱۸۲۴
پست الکترونیکی: mshirzaey@yahoo.com

ضد میکروبی برخی عصاره‌های گیاهی با روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است که در بعضی از آنها فعالیت ضد میکروبی چندین عصاره گیاهی متفاوت به روش آزمایشگاهی علیه چند باکتری محدود دهانی ارزیابی شده است.^(۳-۵)

برای مثال مطالعه Ahmad و همکاران تاثیر ۴۵ گیاه هندی بر پاتوژنهای انسانی مقاوم به داروهای مختلف بررسی شد. در این مطالعه ۴۰ گیاه اثر ضد میکروبی علیه یک یا چند باکتری و ۲۴ گیاه فعالیت ضد قارچی علیه کاندیدا را نشان دادند.^(۵)

با مرور مطالعات گذشته، به وضوح مشخص می شود که مطالعات بسیار کمی در باره تاثیرات ضد میکروبی عصاره گیاهی روی پاتوژنهای دهانی انجام شده است. بخاطر عوارض جانبی کم داروهای گیاهی این مطالعه با هدف ارزیابی اثر ضد قارچی سه گیاه آویشن، میخک و دارچین با نیستاتین در آزمایشگاه دانشکده دندانپزشکی زاهدان در سال ۱۳۹۰ روی فرصت طلب‌ترین پاتوژن حفره دهان یعنی کاندیدا آلبیکانس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه تجربی، سوش استاندارد کاندیدا آلبیکانس شماره Timm2640 در محیط S.C (sabuard dextor Agar) حاوی کلرامفنیکل، کشت داده شد. بعد از مطالعه مقالات و بازنگری روی داده‌های سنتی، ۳ مورد از عصاره گیاهانی که بیشترین خاصیت درمانی روی بیشتر پاتوژنهای دهان نشان داده بودند انتخاب شدند.

گیاهان مورد بررسی در این آزمایش عبارت بودند از میخک، آویشن شیرازی و دارچین. ۳۰ گرم از پودر هر گیاه در ۱۰۰

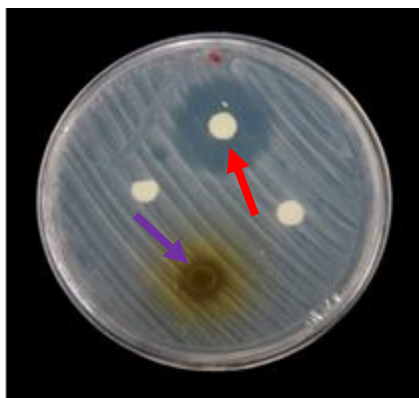
درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت برای تهیه غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر گذاشته شد. سپس ۵۰ دیسک خالی را داخل بشر ریخته و درب آن را بسته و بوسیله اتوکلاو استریل شدند. در شرایط استریل، هر ۱۰ دیسک در محفظه‌ی شیشه‌ای حاوی یکی از انواع عصاره متانول گیاهی قرار داده و روی آن پوشیده شد. ضمناً ۱۰ دیسک هم داخل متانول گذاشته شد. بعد از ۱ ساعت دیسک‌های اشباع شده در شرایط استریل بوسیله انبر برداشته و در انکوباتور ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه خشک گردید. در این آزمایش، روش انتشار دیسک کاغذی استاندارد که بوسیله‌ی Ahmad و همکاران ارائه شده برای ارزیابی فعالیت ضد قارچی استفاده شده است.^(۵)

بدین صورت که ابتدا سوسپانسیونی از کاندیدا در سرم فیزیولوژی استریل تهیه کردیم. به نحوی که کدورت حاصله معادل لوله ۰/۵ واحد مک فارلند شد و سپس با استفاده از یک سوپ استریل از سوسپانسیون مربوطه برداشته و در تمامی سطح یک پلیت محتوی محیط سابر د گسترش داده و سپس داخل هر پلیت، یک دیسک عصاره گیاهی، ۱ دیسک نیستاتین ۱۰۰ واحدی به عنوان کنترل مثبت و یک دیسک متانول و یک دیسک خالی بعنوان کنترل منفی استفاده شد. دیسک‌ها به فاصله ۱۵ میلیمتر از لبه پلیت و ۲۴ میلیمتر از مرکز دیسک بعدی گذاشته شد. تمام پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. هیچ هاله‌ی عدم رشدی اطراف دیسک کنترل منفی دیده نشد و برای هر گیاه این تست ۱۰ بار انجام شد. منطقه مهار هر تست گیاهی علیه کاندیدا با نیستاتین بوسیله ANOVA مقایسه شد.

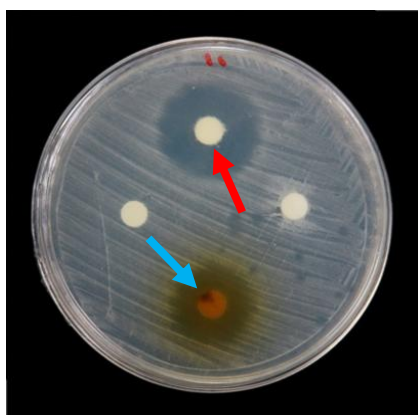
یافته‌ها:

تحقیق روی تعداد ۴۰ نمونه و در هر گروه ۱۰ نمونه انجام گرفت. میزان هاله‌ی عدم رشد بر حسب گروه‌های مورد مطالعه در جدول (۱) ارائه شده است و نشان می دهد که بیشترین تاثیر را نیستاتین به میزان $(32/6 \pm 0/84)$ و بعد دارچین و در مرحله بعدی میخک و بالاخره کمترین خاصیت عدم رشد

میلی لیتر متانول خالص حل شد و محلول به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر (همزن) گذاشته شد، سپس هر عصاره از کاغذ فیلتراسیون whatman شماره یک ساخت انگلستان گذرانده شد. وزن عصاره‌ها پس از فیلتراسیون در بازه‌ی $29/98 \pm 0/01$ گرم بود. در مرحله بعد محلول فیلتراسیون در انکوباتور ۳۷



شکل ۱- مقایسه هاله‌ی عدم رشد آویشن (فلش بنفش) با نیستاتین (فلش قرمز)



شکل ۲- مقایسه هاله‌ی عدم رشد میخک (فلش آبی) با نیستاتین (فلش قرمز)



شکل ۳- مقایسه هاله‌ی عدم رشد دارچین (فلش سبز) با نیستاتین (فلش قرمز)

مربوط به عصاره ی آویشن به میزان (0.82 ± 0.13) بود. آزمون ANOVA نشان داد که تفاوت در مهار کاندیدا از لحاظ آماری معنی‌دار بود. ($P < 0.001$)

جدول ۱- میزان هاله‌ی عدم رشد بر حسب عصاره‌های گیاهی و نیستاتین

گروه‌ها	میزان هاله‌ی عدم رشد در نمونه	فاصله اطمینان ۹۵ درصد
نیستاتین	32.6 ± 0.84	۳۲ تا ۳۲/۲
دارچین	31.3 ± 0.82	۳۱/۹ تا ۳۰/۷
میخک	27.4 ± 0.82	۲۸ تا ۲۶/۸
آویشن	13 ± 0.82	۱۳/۶ تا ۱۲/۴

یک رابطه مستقیم بین قطر هاله‌ی عدم رشد و فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی وجود داشت. هیچ هاله‌ی عدم رشدی اطراف دیسک بلانک و دیسک متانول که بعنوان کنترل منفی وجود داشت دیده نشد. شکل (۱ تا ۳)

میزان هاله‌ی عدم رشد میخک (27.4 ± 0.823) از نیستاتین (32.6 ± 0.843) کمتر بود و در آخر با انجام آزمون T مربوط به مقایسه‌ی میزان هاله عدم رشد بین آویشن و نیستاتین تفاوت معنی‌داری دیده شد.

بحث:

طبق یافته های بدست آمده از مطالعه حاضر، سه گیاه آویشن، میخک و دارچین اثر ضد قارچی خود را نشان دادند که این امر در رابطه با میخک مشابه مطالعات Xia و Wang بود. با این تفاوت که در مطالعه آن ها اثر ضدقارچی میخک با دارویی مثل آمفوتریپسین B سنجیده شده بود. (۶،۷)

Mau و همکاران اثر ضدقارچی چندین گیاه چینی را مورد بررسی قرار دادند که در آن بین اثر ضدقارچی دارچین علیه میکرو ارگانیسم هایی مانند Sachromycess و کاندیدا در محیط آزمایشگاهی دیده شد که مشابه مطالعه ما می باشد با این تفاوت که در مطالعه آن ها اثر ضدقارچی دارچین با دارویی مثل کلرگزیدین مقایسه شده بود. (۸)

سایر مطالعات نیز اثر ضد قارچی دارچین را تأیید نموده اند. اما تفاوت معنی داری بین خاصیت ضد قارچی دارچین با نیستاتین گزارش نکردند که برخلاف مطالعه ما می باشد و شاید به علت تفاوت در روش اجرای کار است. (۹،۱۰)

در مطالعه ای که بوسیله Ahmad و همکاران انجام شد، فعالیت ضد قارچی قوی روغن میخک در محیط آزمایشگاه علیه قارچ های متفاوت مانند کاندیدا آلبیکانس دیده شد. نتیجه ای بدست آمده شبیه نتیجه ای بود که از مطالعه ما بدست آمد. (۱۱)

Suhr و همکاران در مطالعه ای مشابه اثرات ضد قارچی میخک و دارچین را تأیید نمودند. (۱۲)

در مطالعه ای که بوسیله Hammer و همکاران انجام شد فعالیت ضد میکروبی ۵۲ عصاره گیاهی بررسی شد و در این مطالعه حداقل اثر ضد قارچی، مربوط به آویشن بود که مشابه نتیجه ما بود. با این تفاوت که این مطالعه به روش Micro dilution و روی روغن های گیاهی بدست آمده انجام شده بود. (۱۳)

در مطالعه Mathew، اثر ضدقارچی گیاهی آویشن در مقابل قارچ میکوزیس بررسی شده است که این قارچ را از واژن زنان آلوده تهیه کرده بودند. ولی مطالعه ما روی شایعترین پاتوژن دهان انجام شده است. اما این مطالعه می تواند نشانگر اثرات ضد قارچی وسیع تر آویشن باشد. (۱۴)

در مطالعه آزمایشگاهی که به وسیله Omran و همکاران به روش Micro dilution روی گیاهان آویشن، پونه و لیمو انجام گرفته بود مانند مطالعه ما آویشن اثر ضد قارچی خوبی نشان داد. با این تفاوت که با آمفوتریپسین B مقایسه شده بود. (۱۵)

در مطالعه ای بالینی که به وسیله Emtenan روی حیوانات انجام شد اثر ضد قارچی آویشن در کنار گیاهان دیگر مانند رز ماری، البته به مقدار کمتر از مطالعه ما دیده شد. (۱۶)

نتیجه گیری:

با توجه به اینکه کاندیدا به عنوان یک عامل عفونی فرصت طلب دهان مطرح است و به دلیل افزایش مقاومت دارویی که در داروهای ضد قارچی شیمیایی به وجود آمده است، توجه بیشتری به استفاده از گیاهان دارویی شده است و به نظر می رسد که دارچین و میخک و آویشن اثر ضد قارچی مناسبی نسبت به نیستاتین نشان دادند. انجام مطالعات بالینی در این زمینه پیشنهاد می گردد.

References:

- 1- Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. Garlic Natural Health Products Exhibit Variable Constituent Levels And Antimicrobial Activity Against *Neisseria Gonorrhoeae*, *Staphylococcus Aureus* and *Enterococcus Faecalis*. *Phytother Res*. 2005 Apr;19(4):327-34.
- 2- Gürkan CA, Zaim E, Bakirsoy I, Soykan E. Short-term Side Effects of 0.2% Alcohol-Free Chlorhexidine Mouthrinse Used As An Adjunct To Nonsurgical Periodontal Treatment: A Double-Blind Clinical Study. *J Periodontol*. 2006 Mar;77(3):370-84.
- 3- Saeki Y, Ito Y, Shibata M, Sato Y, Okuda K, Takazoe I. Anti Microbial Action Of Natural Substances On Oral Bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1989 Aug;30(3):129-35.
- 4- Singh HB, Srivastava M, Singh AB, Srivastava AK. Cinnamon Bark Oil, A Potent Fungitoxicant Agent Fungi Causing Respiratory Tract Mycoses. *Allergy*. 1995 Dec;50(12):995-9.
- 5- Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial And Phytochemical Studies On 45 Indian Medicinal Plants Against Multi, Drug Resistant Human Pathogens. *J Ethnopharmacol*. 2001 Feb;74(2):113-23.
- 6- Xia L, Ng TB. Isolation Of Alliumin, A Novel Protein With Antimicrobial And Antiproliferative Activities From Multiple-Cloved Garlic Bulbs. *Peptides*. 2005 Feb;26(2):177-83.
- 7- Wang HX, Ng TB. Purification of Allivin A Novel Antifungal Protein From Bulbs Of the Round, Clove, Garlic. *Life Sci*. 2001 Dec 7;70(3):357-65.
- 8- Mau J, Chen C, Hsieh P. Antimicrobial Effect of Extracts From Chinese Chive, Cinnamon And Corni Fructose. *J Agric Food Chem*. 2001 Jan;49(1):183-8.
- 9- De M, Krishna De A, Banerjee AB. Antimicrobial Activity of Some Indian Medicinal Spices. *Phytother Res*. 1999 Nov;13(7):616-8.
- 10- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial And Antioxidant Properties of Rosemary And Sage And Cinnamon (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *J Agric Food Chem*. 2007 Sep 19;55(19):7879-85. Epub 2007 Aug 21.
- 11- Ahmad N, Alam MK, Shehbaz A, Khan A, Mannan A, Hakim SR, et al. Antimicrobial Activity Of Clove Oil & Its Potential In the treatment of vaginal candidiasis. *J Drug Target*. 2005 Dec;13(10):555-61.
- 12- Suhr KI, Niilsen PV. Antifungal activity of Essential Oils Evaluated by Two Different Application Techniques Against Rye Bread Spoilage Fungi. *J Appl Microbiol*. 2003;94(4):665-74.
- 13- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial Activity of Essential Oils Other Plants Extracts. *J Appl Microbiol*. 1999 Jun;86(6):985-90.
- 14- Mathew BP, Nath M. . Recent Approaches To Antifungal Therapy for Invasive Mycoses. *ChemMedChem*. 2009 Mar;4(3):310-23.
- 15- Omran SM, Esmaeilzadeh S, Rahmani Z. Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method. *Jundishapur J Microbiol*. 2010; 3(4): 161-7.
- 16- Emtenan M, Hanafi, Madeha M, Abdel-Khader, Seham S, Kassem, et al. Aroma-Therapy for endometri induced by candida albicans. *J Academic research*. 2010;2(5):111-116

